



TITLE:

細胞リプログラミングにおける分泌型EPHA7の機能の同定と解析(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

李, 俊成

CITATION:

李, 俊成. 細胞リプログラミングにおける分泌型EPHA7の機能の同定と解析. 京都大学, 2015, 博士(生命科学)

ISSUE DATE:

2015-11-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19386>

RIGHT:

許諾条件により本文は2016-04-01に公開

京都大学	博士（生命科学）	氏名	李俊成
論文題目	細胞リプログラミングにおける分泌型EPHA7の機能の同定と解析		
(論文内容の要旨)			
<p>体細胞に特定の転写因子を強制発現することで細胞のリプログラミングが誘導され、ES (胚性幹)細胞と同様の無限の分裂能と多能性を持つ iPS (人工多能性幹)細胞が作製できる。細胞リプログラミングのメカニズムについては、遺伝子発現の網羅的な解析などによって徐々に明らかになっているが、リプログラミング過程に影響を及ぼす細胞間情報伝達経路については十分に解明されていなかった。申請者は、細胞間相互作用に関わる重要な因子である EPH-EPHRIN シグナリングに着目し、細胞リプログラミング制御に重要な EPH、又は EPHRIN を同定し、機能を解明することを目指した。まず、マウス胚性線維芽細胞 (MEF)のリプログラミング過程における EPH 受容体と EPHRIN ファミリーの遺伝子発現変化を定量的 RT-PCR を用いて調べた。その結果、EPH 受容体 A7 (EPHA7)の発現が一過的に上昇している事を見出した。<i>EphA7</i>のノックダウンを行ったところ、リプログラミングにおける <i>Nanog</i> 発現レベルの上昇と NANOG 陽性コロニー数の増加が共に抑制された。このことは、EPHA7 の一過的発現上昇がマウス体細胞のリプログラミングに重要であることを示している。EPHA7 には、全長型と分泌型 (切断型) のスプライスバリエントがあり、両方ともリプログラミング過程において一過的な発現上昇が見られた。そこで、どちらのスプライスバリエントが重要であるかを調べるために、<i>EphA7</i>をノックダウンした MEF に全長型 EPHA7 を発現させるか、あるいは分泌型 EPHA7 を加える操作を行ったところ、分泌型 EPHA7 を加えた時にのみリプログラミング効率が上昇した。この結果により、分泌型 EPHA7 が細胞リプログラミングを制御する因子であることが示唆された。マウス ES 細胞が分化する際に ERK1/2 が活性化すること、またリンパ腫細胞において、分泌型 EPHA7 が ERK1/2 の活性化を抑制することが報告されていたことから、申請者は分泌型 EPHA7 が ERK1/2 の活性化を制御することでリプログラミングを制御しているのではないかと考えた。そこで、リプログラミング過程における ERK1/2 活性 (リン酸化型、活性型 ERK1/2)の変化を調べたところ、リプログラミング過程の中期において活性型 ERK1/2 のレベルが低下することを見出した。<i>EphA7</i>のノックダウンを行うと、この活性型 ERK1/2 レベルの減少が抑制された。そこに分泌型 EPHA7 を添加すると、活性型 ERK1/2 レベルの減少が再び見られた。また、ERK1/2 活性化因子 MEK の阻害剤を添加したところ、分泌型 EPHA7 の添加と同様に、リプログラミング効率の上昇が見られた。MEK 阻害剤と分泌型 EPHA7 の添加の効果は相加的ではなかった。以上の結果は、分泌型 EPHA7 が ERK1/2 活性の低下を誘導することにより、リプログラミングを促進していることを示している。本研究は、リプログラミングにおける分泌因子の重要性を示すものである。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

申請者は、リプログラミングに影響を及ぼす細胞間情報伝達メカニズムの解明を目的として研究を行い、リプログラミングを促進する分泌因子として、分泌型 **EPHA7** を新たに同定した。申請者は、細胞間コミュニケーションに重要な役割を持っている **EPH-EPHRIN** シグナル伝達系に着目し、リプログラミング過程における **EPH** および **EPHRIN** ファミリーの発現を網羅的に調べ、**EPHA7** が一過的に発現上昇することを見出した。**EPHA7** には全長型 **EPHA7** とスプライスバリエントである分泌型(切断型) **EPHA7** が存在するが、両者とも一過的に発現上昇することを明らかにした。また、実際に分泌型 **EPHA7** が培地に分泌されることも明らかにした。次に、*EphA7* のノックダウンを行ったところ、リプログラミング効率が顕著に低下し、**EPHA7** の一過的な発現上昇がリプログラミングに重要であることを示した。さらに、全長型 **EPHA7** の発現では、*EphA7* ノックダウンによるリプログラミング効率の低下が回復せず、分泌型 **EPHA7** の添加によりリプログラミング効率が改善することを示し、分泌型 **EPHA7** の重要性を明らかにした。また、**OCT3/4** が **EPHA7** の発現を制御する重要な因子であることを見出した。次に申請者は、マウス **ES** 細胞が分化する際に **ERK1/2** が活性化することに着目し、リプログラミング過程における **ERK1/2** 活性を調べた。その結果、リプログラミング過程中期において **ERK1/2** 活性が低下することを見出した。*EphA7* のノックダウンを行うと、リプログラミング過程における **ERK1/2** 活性の低下が抑制され、分泌型 **EPHA7** を添加することにより **ERK1/2** 活性の低下が再び見られることを示した。さらに、**ERK1/2** 活性化因子 **MEK** の阻害剤の添加が、分泌型 **EPHA7** の添加と同様に、リプログラミング効率を改善させることを見出した。分泌型 **EPHA7** と **MEK** 阻害剤を同時に添加した場合、単独で加えた場合と同程度のリプログラミング効率の改善が得られたことから、分泌型 **EPHA7** と **MEK** 阻害剤は同じ作用機序を持つことが示唆された。以上の結果から、**ERK1/2** 活性の低下が細胞リプログラミングの進行に必要な現象であること、また、**ERK1/2** 活性を制御する因子が分泌型 **EPHA7** であることが明らかになった。本論文は、分泌型 **EPHA7** のリプログラミング過程における機能を同定し、その機構を解析したものであり、細胞リプログラミングの機構解明に大きく貢献するものである。これら一連の研究において、申請者の持つ生命科学に関する高度で幅広い学識並びに専攻分野における優れた研究能力が示されている。また、本論文は生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見について論じたものであり、論理的かつ一貫性を持って記述されている。以上より、本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。また、平成 27 年 10 月 13 日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、申請者を合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第 8 条の規定により、猶予期間は学位授与日から 3 ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 年 月 日